

# TRANSGENIC CLONED COW PRODUCING HUMAN ALPHA1-ANTITRYPSIN AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

**Publication number:** KR20040045528 (A)

**Publication date:** 2004-06-02

**Inventor(s):** CHO JONG GI; HWANG WOO SUK; JANG GU; JUNG UI BAE; KANG SEONG GEUN; KIM SUN UNG; LEE BYEONG CHEON; PARK EUL SUN; PARK HUI JEONG +

**Applicant(s):** HWANG WOO SUK +

**Classification:**

- **international:** **C12N5/16; C12N5/16; (IPC1-7): C12N5/16**

- **European:**

**Application number:** KR20020073333 20021123

**Priority number(s):** KR20020073333 20021123

## Abstract of KR 20040045528 (A)

PURPOSE: Transgenic cloned cow producing human alpha1-antitrypsin and a method for producing the same are provided, thereby economically and efficiently producing biological medicines from the cloned animals. CONSTITUTION: The method for producing the transgenic cloned cow producing human alpha1-antitrypsin comprises the steps of: (a) preparing nucleus donor cells by transferring a gene encoding human alpha1-antitrypsin to somatic cell lines collected from cow; (b) preparing matured nucleus recipient ova collected from cow by removing oocytes from nucleus recipient ova of cow and removing cytoplasm including the first polar body; and (c) transferring the nucleus donor cells to the matured nucleus recipient ova and fusing them, wherein the somatic cells are collected from matured cow; and the nucleus transplanted ovum is SNU-B3(KCTC 10356BP).

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

# (19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 5/16

(11) 공개번호  
(43) 공개일자

10-2004-0045528  
2004년06월02일

(21) 출원번호 10-2002-0073333  
(22) 출원일자 2002년11월23일

(71) 출원인 황우석  
서울 강남구 논현1동 11-25

(72) 발명자 황우석  
서울 강남구 논현1동 11-25

이병천  
서울특별시관악구봉천7동239-1호압동관106호

강성근  
서울특별시관악구봉천7동서울대학교교직원아파트936동807호

정의배  
충청북도청주시흥덕구수곡동세원홍실아파트101동1306호

조종기  
서울특별시송파구가락2동140가락쌍용아파트303동1007호

김순용  
서울특별시관악구봉천4동875-1관악캠퍼스타워613호

박을순  
충청북도음성군대소면태생리한양아파트202동906호

장구  
서울특별시관악구봉천2동1703봉천아파트104동1805호

박희정  
서울특별시송파구거여동거여2단지동아아파트201동1203호

(74) 대리인 손민  
이세진  
김성남

심사청구 : 없음

## (54) 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 형질전환 복제소 및이것의 생산 방법

### 요약

본 발명은 사람 알파1-안티트립신(Alpha1-antitrypsin)을 발현하는 유전자를 성숙한(adult) 소에서 유래한 체세포에 도입 및 격증시키는 단계; 상기의 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 외래 유전자가 도입 및 격증된 체세포를 이용 하여 복제소를 생산하는 단계를 포함하는 형질전환 복제소의 생산방법 및 이러한 방법에 의해 생산된 알파-1 안티트립신을 발현하는 형질전환(transgenic) 복제소에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자를 성숙한 소의 체세포에 도입 및 적중시키고, 상기 형질 전환된 체세포를 이용하여 생산된 복제소의 유선으로부터 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

도표도

## 도 1

색인어

사람 알파1-안티트립신, 체세포 복제, 형질전환 복제 소

명세서

## 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 체세포에 사람 알파1-안티트립신을 도입 및 적중시키기 위한 pGFP- $\alpha$ 1-AT 플라스미드 작제도이다.

도 2는 본 발명의 외래 유전자가 도입 및 적중된 세포의 GFP 발현을 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명에서 사용되는 고정용 피펫(1)과 절개용 피펫(2)으로 수핵난자(3)의 투명대를 절개하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 4는 탈핵 과정으로 고정용 피펫과 절개용 피펫으로 수핵난자의 제 1극체와 핵을 제거하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 5는 본 발명에서 사용되는 고정용 피펫과 이식용 피펫(4)으로 탈핵된 난자에 체세포를 이식하는 과정을 나타낸 사진이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유전자 도입(transfection) 및 적중(targeting)기술과 체세포 복제 기술을 접목한 형질전환동물(transgenic animal)을 생산하는 방법 및 이러한 방법에 의해 생산된 형질전환동물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 형질 전환동물을 이용하여 인간 유용단백질 또는 생물의약품 생산하는 방법에 관한 것이다.

보다 구체적으로, 본 발명은 사람 알파1-안티트립신(Alpha1-antitrypsin, 이하 ' $\alpha$ 1-AT'라 한다)을 발현하는 유전자를 성숙한(adult) 소에서 유래한 체세포에 도입 및 적중시키고, 상기 사람  $\alpha$ 1-AT를 발현하는 외래 유전자가 도입 및 적중된 체세포를 이용하여 형질전환 복제소를 생산하는 방법 및 이러한 방법에 의해 생산된 형질전환 복제소에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 형질전환 복제소는 유선에서 사람  $\alpha$ 1-AT를 생산하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 유전자 도입 및 적중 기술과 체세포 복제 기술을 접목하여 사람  $\alpha$ 1-AT를 용이하게 얻는 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 성숙한 소에서 유래한 체세포에 사람  $\alpha$ 1-AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키고, 상기 형질전환된 체세포를 복제하여 유선에서 사람  $\alpha$ 1-AT를 발현하는 형질전환 복제소를 생산함으로써 소의 우유로부터 용이하게 사람  $\alpha$ 1-AT를 수득하기 위한 방법에 관한 것이다.

$\alpha$ 1-AT는 간세포에서 합성된 후 혈액 내로 분비되며, 혈장 내에 존재하는 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin), 엘라스타제(elastase), 콜라게나제(collagenase), 트롬빈(thrombin) 및 플라스민(plasmin)과 같은 대부분의 세린계 단백질 분해효소에 대한 저해제들과 함께 설파린족(serpin family)에 속 한다. 또한,  $\alpha$ 1-AT는 분자량이 52kD(kilo

dalton)인 당단백질이 생리적 기능은 중성 백혈구의 엘리스타제에 대한 저해제로 작용하며, 특히 페포에 존재하는 탄성섬유(elastic fiber)가 중성백혈구의 엘리스타제에 의해 분해되는 것을 막아준다.

$\alpha$ 1-AT과 관련된 병리적 증상을 일으키는 선천적인 유전자 변이는 많이 알려져 있으며(Carrell et al., Mol. Biol. Med. 6, 35-42, 1982), 이들 대부분이 혈장 내의  $\alpha$ 1-AT 농도를 감소시켜서 단백질 분해효소-저해제의 균형이 깨어지며, 이로써 허파는 신축성을 잃게 되고 호흡기중으로 진전된다(Gadek and Crystal, in Metabolic Basis of Inherited Disease. Stanbury et al., Eds., McGraw-Hill, New York. pp.1450-1467, 1983).

상기와 같은 유전적 결함에 의한 호흡기중 외에도 파다한 흡연이나 심한 환경공해로 인한 단백질 분해효소 저해제의 불활성화로 인해 호흡기중이 유발되기도 한다.

현재 북미와 유럽의 백인종에서 주로 발견되는 이러한 유전적 질환을 극복하기 위하여 매년 1억\$ 이상의  $\alpha$ 1-AT 시장이 형성되어 있고, 혈액에서 추출된  $\alpha$ 1-AT가 치료제로 투여되고 있다. 한편, 쇼크 중후군은 중성백혈구의 갑작스런 대량 방출로 인해 혈장 실린과 단백질분해효소사이의 균형이 파괴되어 야기되는 것으로 알려져 있다.  $\alpha$ 1-AT는 급성 쇼크 중후군의 치료에도 사용될 수 있다(Robin W. Carrell, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 4, 291-297, 1986)고 보고된 바 있다. 그러나 원료의 제한과 바이러스 등의 감염 문제 때문에 유전공학 기법을 통한 안전하고 경제적인 생산이 연구되어 왔다.

$\alpha$ 1-AT 단백질을 코드화하는 DNA 염기서열은 이미 알려져 있으며(Long et al., Biochemistry 23, 4828, 1984), 보고에 따르면  $\alpha$ 1-AT 유전자를 대장균(Bollen et al., FEBS Lett. 16, 67, 1984; Courtney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 669, 1984; Tessier et al., FEBS Lett. 208, 183, 1986; Johnsen et al., Mol. Biol. Med. 4, 291, 1987; Sutiphong et al., Mol. Biol. Med. 4, 307, 1987; 이상철 및 유명희, 한국생화학회지 22, 148, 1989; Lee et al., Molecules and Cells 3, 71-74, 1993) 또는 효모(Travis et al., J. Biol. Chem. 260, 4384, 1985; Rosenberg et al., Nature 312, 77, 1984; Cabezon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6594, 1984; 김진미 등, 한국생화학회지 23, 236, 1990; 김무경 등, 미생물 학회지 30, 108, 1992)에서 발현시킨 바 있다. 그러나 효모에서 생산된 당화되지 않은  $\alpha$ 1-AT는 시험관 내에서 내열성이 떨어졌으며, 이와 같은 내열성의 감소는 생체 내에서의 반감기의 감소와 밀접한 상관관계가 있음이 보고되었다(Travis et al., J. Biol. Chem., 260, 4384, 1985).

상기와 같이  $\alpha$ 1-AT의 포유동물 세포의 대규모 배양은 비싸고 고도의 기술이 요구되므로 높은 투여량을 요하는 치료에 있어서 필요한 양을 맞추기가 어렵다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 포유동물로부터  $\alpha$ 1-AT를 생산하는 연구가 있었다. 그 예로서,  $\alpha$ 1-AT 생성 반감기로서 형질전환된 동물인 쥐(Archibald et al., 1990) 및 양(Wright et al., 1991)으로부터  $\alpha$ 1-AT를 생산하였다.

하지만 상기 방법들은 형질전환 동물 생산을 위한 외래 유전자의 도입 방법으로 전핵 내 미세주입법(pronuclear microinjection)을 사용하였다. 하지만, 이 방법은 극히 낮은 생산 효율(5% 이하)을 나타내었으며, 특히 모자이크형(Mosaicism)이 나타나므로 원하는 유전자가 도입된 완전한(homologous)한 형질전환동물을 얻기 위해서는 또 다시 자손 간의 교배를 거쳐야 하는 문제점이 있었다. 즉, 전핵 내 미세주입법은 원하는 유전자를 수정 후 약 18~24시간 내에 전핵(pronuclei)에 삽입함으로써 이루어지는데, 이렇게 생산된 동물은 키메라를 형성하게 된다. 따라서 원하는 완전한(homologous)한 형질전환 동물을 얻기 위해서는 또 다시 수정을 통하여 완전한 전환형질을 가진 산자를 얻어야 한다 는 비효율적인 점이 있다. 특히, 쇼와 같은 임신 기간이 긴 동물의 경우(200일 이상)에는 형질전환동물을 얻기까지는 너무 많은 시간이 소요된다는 문제점이 있다. 따라서 원하는 고순도의 단백질을 경제적으로 빠른 시간 내에 생산할 수 있는 요구가 계속되어왔다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 발명에서는 외래 유전자 도입 및 적응기술과 체세포 복제기술을 접목하고자 한다. 또한, 이 과정에서 체세포를 성체에서 유래한 것을 사용함으로써 능력이 뛰어난 것으로 이미 확인된 소성체(adult)의 유전형질을 그대로 이어받을 수 있는 방법을 제공하면서도 외래 유전자의 완전한 도입을 가능하게 한다. 즉, 본 발명에서는 복제소의 성(sex) 유도가 중요한데, 이 문제는 성별이 이미 확정된 성체로부터 유래한 체세포를 이용하면서도 높은 복제 성공률을 가능하게 하는 방법을 제공하고자 한다.

본 발명은 짧은 기간 내에 외래 유전자가 도입된 형질전환동물을 생산하여 이로부터 인간 유용단백질을 용이하게 수득할 수 있는 방법을 제공하고자한다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이상과 같이, 본 발명은 유전자 도입 및 적응 기술을 이용하고 체세포 복제 기술을 접목함으로써 형질전환동물을 생산하고 이를 이용하여 원하는 단백질을 경제적이고 고 순도로 얻을 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

이에 본 발명은 소에서 유래한 외래(exogenous) 유전자가 도입 및 적중된 체세포의 핵과 소 유래의 탈핵 난포 세포가 융합된 핵 이식란을 제공하고자 한다.

한가지 관점으로서, 소의 유선에서 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 형질전환 복제 소를 제공하고자 한다.

다른 관점으로서, 소에서 유래한 체세포주에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함하는 공여핵 세포를 준비하는 단계; 수핵난자의 난구 세포를 제거하고, 수핵난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함하는 소 유래의 성숙한 수핵난자를 준비하는 단계; 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시켜 핵 이식란을 작제하는 단계를 포함하는 소의 핵 이식란을 작제하는 방법을 제공하고자 한다.

또 다른 관점으로서, 소에서 유래한 체세포주에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함하는 공여핵 세포를 준비하는 단계; 수핵난자의 난구 세포를 제거하고, 수핵난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함하는 소 유래의 성숙한 수핵난자를 준비하는 단계; 및 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시켜 핵 이식란을 작제하는 단계; 및 상기 핵 이식란을 대리모에 이식하여 산자를 출산하는 단계를 포함하는 소의 유선에서 사람  $\alpha 1$ -AT를 생산하는 형질전환 복제 소의 생산방법을 제공하고자 한다.

또 다른 관점으로서, 소의 유선에서 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 형질전환 복제 소의 유로부터 사람  $\alpha 1$ -AT를 수득하는 것을 특징으로 하는 사람  $\alpha 1$ -AT를 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

### 발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유전자 적중 및 도입 기술과 체세포 복제 기술을 접목한다. 즉, 본 발명은 체세포 단계에서 체세포에 특정 유전자를 도입 및 적중하는 단계 및 상기 특정 유전자가 도입 및 적중된 체세포를 이용하여 체세포 수준에서 전환된 형질을 그대로 보유한 형질전환동물을 생산하는 체세포 복제 기술을 단계를 포함한다.

즉, 본 발명은 성숙한 소에서 유래한 체세포에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계; 상기 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자가 도입 및 적중된 체세포를 이용하여 복제소를 생산하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명의 형질전환 엘브리오의 생산방법은 성숙한 소에서 유래한 체세포에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계 및 소의 난자를 탈핵하여 상기 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자가 도입 및 적중된 체세포를 탈핵된 난자로 도입하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 재구성 엘브리오 및 형질전환 복제소는 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 외래 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명은 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 형질전환 복제소로부터 사람  $\alpha 1$ -AT를 용이하게 생산하는 방법을 제공한다.

### 용어의 정의

본 발명에 따른 특성상 본원 명세서에 사용되는 용어의 정의를 명백히 할 필요가 있다. 일반적으로는 본 발명에서 별도로 정의하지 아니한 모든 기술적 및 과학적인 관련 용어는 이 발명에 속한 기술 분야에서 통상적으로 통용되는 의미를 가진다. 그러나 다음의 용어들은 통상적인 의미를 나타내지만 그 의미를 명확히 하고 또한 본 발명의 범위를 명백히 하고자 다음과 같이 정의한다.

본원 명세서에 사용된 용어 '백터'는 알파1-안티트립신을 인코딩하는 핵산의 삽입, 전달 또는 발현을 허용하는 플라스미드, 코스미드, 파지, 바이러스, 레트로바이러스 또는 다른 담체를 말한다.

본원 명세서에 사용된 용어 '프로모터'는 알파1-안티트립신 cDNA의 전사를 조절하는 조절 DNA 서열을 말한다.

본원 명세서에 사용된 용어 '형질전환(transformation)'은 세포가 원래의 성질과는 다른 새로운 성질을 얻게되는 것을 말하며, 이러한 형질전환은 세포가 자라면서 원래와는 다른 돌연변이체로 바뀌었기 때문에 나타나는 것이며, 특히 돌연변이 결과 세포의 성장에 변화가 나타난 것을 일반적으로 세포의 형질전환이라고 말한다. 세포의 형질전환은 살아 있는 생명체에서는 정상적인 세포가 종양세포로 발전할 가능성을 가지게 하는 것이고, 배양 중인 세포에서는 세포가 비정상적으로 증식할 수 있도록 해주기도 한다. 그 한 예로 정상 세포는 배양접시에서 세포가 단 층으로 자라게되면 성장을 멈춘다. 그러나, 형질전환된 세포는 단층이 형성되더라도 계속하여 증식하여 다층으로 자랄 수 있게 된다. 이와 같은 세포 성장 양상의 변화를 세포의 형질전환이라고 말한다. 즉, 세포가 이형성 핵산 서열의 발현을 허용하는 결합을 말한다.

본원 명세서에 사용된 용어 '형질전환동물(transgenic animal)'은 '유전자 이식 동물'이라 불리우기도 하며 동물 자신이 원래 가지고 있지 않은 외래의 유전자를 제조함으로써, 이들 동물의 염색체 상에 인공적으로 삽입시킴으로써 그 형질의 일부가 변화된 동물을 말한다. 형질전환동물은 인간이 필요로 하는 생리활성 물질을 생산하는 바이오액터(Bio-reactor), 특정 질환을 유전적으로 나타내는 질환모델동물, 인간의 이식용 장기 등을 생산할 수 있는 형질전환동물 등을 들 수 있다.

본원 명세서에 사용된 용어 '핵이식'은 우량종 암컷의 수정란에서 분열된 여러 개의 핵을 분리해 떼어낸 뒤 각 핵이 없는 난자와 인공적으로 결합시켜 동일한 우량형질을 갖는 여러 마리의 복제동물을 생산하기 위한 유전자 조작기술을 의미하는 것으로, 본 발명에서는 어미 소의 유전형질을 분리된 핵구 속에 포함되게 하여 전달시킴으로써 분할된 핵구의 수에 따라 우량형질의 복제소를 생산할 수 있다.

구체적으로 본 발명은 체세포 복제 기술을 이용하여 형질전환 동물을 생산하기 위해서 원하는 유전자를 체세포에 도입 및 적중하는 단계; 및 상기 형질전환된 체세포를 이용하여 복제 동물을 생산하는 단계로 이루어진다.

좀 더 구체적으로, 본 발명은 소에서 유래한 체세포주에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 형질전환 복제소의 생산방법은 소에서 유래한 체세포주에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현 하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함하는 공여핵 세포로 준비하는 단계; 수핵난자의 난구 세포를 제거하고, 수핵난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함하는 소 유래의 성숙한 수핵난자를 준비하는 단계; 상기 단계에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시켜 핵 이식란을 작제는 단계; 및 상기 핵 이식란을 대리모에 이식하여 산자를 출산하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명의 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자가 도입된 형질전환 엠브리오의 생산방법은 성숙한 소에서 유래한 체세포에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명의 사람  $\alpha 1$ -AT를 생산하는 방법은 소의 유선에서 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 형질전환 복제 소의 유로부터 사람  $\alpha 1$ -AT를 수득하는 것을 포함한다.

또한, 본 발명의 형질전환 복제소는 유선에서 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 외래 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명의 형질전환 엠브리오의 생산방법은 성숙한 소에서 유래한 체세포에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계 및 소의 난자를 탈핵하여 상기 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자가 도입 및 적중된 체세포를 탈핵된 난자로 도입하는 단계를 포함한다.

이하에서는 소의 유로부터 사람  $\alpha 1$ -AT를 얻을 수 있는 형질전환 복제 소를 생산하는 방법을 단계별로 나누어 구체적으로 설명한다.

#### 사람 알파1-안티트립신( $\alpha 1$ -AT)을 발현하는 유전자를 체세포에 도입 및 적중하여 체세포를 형질전환하는 단계

본 발명에서는  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 체세포에 도입하는 방법으로 생화학적 방법(biochemical method), 물리적 방법(physical method), 바이러스 매개 형질 전환방법(virus mediated transfection method) 등을 사용할 수 있다.

생화학적 방법으로는 칼슘을 매개체로 하는 칼슘 침전법, 세포막 성분인 양이온 리피드를 매개체로 하는 리포펙션(lipofection) 또는 리피드는 아니지만 양전하를 지니는 폴리머(polymer)를 매개체로 하는 방법 등을 사용할 수 있는데, 이는 실험의 용이성과 효율성 및 안정성 측면에서 많이 이용되는 방법이기도 하다.

물리적인 방법으로 일렉트로포레이션(electroporation), 유전자 총(gene gun), 세포 내 직접 미세주입법 등을 사용할 수 있다.

바이러스 매개 방법으로는 아데노바이러스(adenovirus) 또는 레트로바이러스(retrovirus)의 바이러스 게놈(genome)에 원하는 DNA를 클로닝하여 세포에 감염시키는 방법이 사용될 수 있다.

바람직하게는, 본 발명에서는 유전자의 도입을 위한 벡터를 작제하고 생화학적 방법으로 유전자를 도입 및 적중하는 방법을 사용할 수 있다. 더 바람직하게는, 유전자의 도입을 위한 벡터를 작제하고 리피드-매개 방법(lipid-mediated method)을 이용하여 사람  $\alpha 1$ -AT를 도입 및 적중할 수 있다.

**제1단계: 사람 알파1-안티트립신( $\alpha 1$ -AT)를 발현하는 유전자의 도입 및 적중을 위한 벡터의 작제**

본 발명에 사용되는 플라스미드들은 표준 DNA 클로닝 과정과 PCR 방법에 의해 작제된다. 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자의 도입 및 적중에서 있어서 사용되는 벡터를 작제하기 위한 pcDNA3는 상업적으로 시판되고 있는 것(Invitrogen, Groningen, Netherlands)을 사용할 수 있다.

사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자의 도입 및 적중을 위한 벡터는 소의 유전에서 사람 유전자가 발현할 수 있도록 소  $\beta$ -카세인 프로모터가 포함될 수 있다. 사람 유전자로  $\alpha 1$ -AT 유전자가 포함될 수 있고, 또한 마커 유전자가 더 포함될 수 있다. 마커 유전자로는 녹색 형광을 나타내는 유전자(GFP)가 사용될 수 있다.

PCR 증폭으로 준비한 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자, 소  $\beta$ -카세인 프로모터 및 GFP는 TA 클로닝 방법으로 벡터 내로 삽입된다.

## 제2단계: 체세포주의 확립

본 발명에는 성숙한(adult) 소에서 수득하여 배양한 세포주를 공여세포로 준비한다. 이때, 소의 품종이 특별히 제한되는 것은 아니나, 한우 또는 홀스타인종(Holstein)의 젖소를 사용함이 바람직하다.

소에서 수득한 세포는 소의 자궁관류액, 자궁내막, 난관, 귀 또는 근육으로부터 분리된 세포, 난구세포 또는 태아섬유아세포이며, 이들을 마더(Mather)와 바네스(Barnes)의 방법 (참조: Mather amp; Barnes, Methods in Cell Biology, Vol.57, Animal Cell Culture Methods, Academic Press, 1998)을 응용하여 배양함으로써 세포주를 작제한다.

예를 들어, 자궁관류액에 P/S항생제(페니실린 10,000IU, 스트렙토마이신 10mg)가 함유된 인산염 완충 식염수(PBS)를 첨가하고, 원심분리하여 세척한 다음, 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), 비필수 아미노산(NEAA, non-essential amino acid) 및 P/S항생제가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagles medium)에서 39°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한다.

자궁내막의 일부 또는 난관으로부터 난관상피 조직을 채취하여, 상기 PBS로 세정하고, 트립신(trypsin)과 EDTA가 포함된 용액에서 정지한 다음, 이를 원심세정하고 상기한 조건에서 배양한다.

적중된 난자 복합체(cumulus-oocyte complexes)를 하이알루로니다제(hyaluronidase)로 처리하여 난자를 둘러싸고 있는 난구 세포층을 분리하고, 난구 세포층에 상기 트립신-EDTA 용액을 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>의 포화습도 배양기 내에 정지시킨 후, 원심 세정하고 상기한 조건에서 배양한다.

귀의 피부 조직으로부터 채취된 연골 조직, 연한 피부 내측의 조직, 근육조직 또는 태아의 동체와 사지 부위에서 연골 조직을 포함하지 않는 부위의 조직을 세정하고 세척한 다음, 상기 트립신-EDTA 용액 및 콜라게나제(collagenase type II) 용액을 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>의 포화습도 배양기 내에 정지시킨 후, 원심세정시키고 상기한 조건에서 배양한다.

이처럼 작제된 세포주는 일정 시간 간격으로 세포주의 배양액을 제거하고 트립신-EDTA 용액을 첨가하여 정지한 다음, 새로운 배양액으로 교체하여 배양하는 계대 배양, 윌머트(Wilmut) 등의 방법을 응용하여 배양 중인 세포주의 배양액을 소 태아 혈청이 첨가된 DMEM으로 교체하여 배양하는 혈청기아배양(참조: Wilmut et al., Nature, 385:810-813, 1997) 또는 동결보존 등의 방법을 통하여 보존하며, 보존된 세포주는 공여세포로서 제공된다.

## 제3단계: 외래 유전자의 체세포로의 도입

외래 유전자를 세포 내에 도입은 작제된 발현 플라스미드를 체세포 내로 도입시키는 방법으로 행한다. 외래 유전자를 세포 내로 도입시키는 방법으로는 생화학적 방법, 물리적 방법, 바이러스 매개 형질 전환방법 등을 사용할 수 있다.

바람직하게는 본 발명에서는 생화학적인 방법으로 FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA), 리포펙타민 플러스(LipofectAmine Plus, Life Technologies) 및 엑스젠 500(ExGen 500, MBI Fermentas)을 사용할 수 있다.

FuGene6는 다성분 지방계 시약(multi-component lipid based reagent)으로서 다양한 세포 타입에서 높은 도입 효율을 가지고 세포 독성이 없으며, 혈청 첨가 여부에 관계없이 기능을 발휘하고 최소한의 최적화 작업이 쉬운 장점을 가진다.

리포펙타민 플러스는 양전하 지방(cationic lipid)이며, 엑스젠 500은 비지방 양전하 중합체(non lipid cationic polymer)로 여러가지 세포 타입에서 높은 효율이 보고되어 있다.

본 발명에서는  $\alpha 1$ -AT 유전자의 도입 및 적중을 위하여 바람직하게는 FuGene6을 이용한다. 즉,  $\alpha 1$ -AT 유전자를 리포솜 형성 성분과 혼합하여 생성된 리포솜-DNA 구조 복합체(liposome-DNA construct complex)를 세포 배양액에 첨가하여 일정시간 배양하고, 이 복합체(complex)의 DNA 구조가 세포 내로 도입되도록 50~70%정도 단층 증식(confluency)한 세포에 트랜스펙션을 실시한다. FuGene6을 통한 효과적인 도입을 위해서는 세포마다 최적 방법을 선정하고 각 변수(parameter)들을 최적화하여 유전자를 도입, 알파1-안티트립신 발현을 극대화한다.

구체적으로, 본 발명에서 제 3단계에서는 상기 2단계에서 준비된 세포주에 사람  $\alpha 1$ -AT를 발현하는 유전자를 도입 및 적중시킨다. 즉, 상기 1단계의 발현 플라스미드와 시약을 혼합하여 배양 배지에 함께 배양한다. 유전자의 도입 및 적중 후, 도입 및 적중된 세포를 자외선 하에서 표준 플루오레세인 이소티오시아나이드(Fluorescein Isothiocyanate, 이하 'FITC'라 한다) 필터 셋을 이용하여 검사한다.

#### 제4단계: 알파1-안티트립신( $\alpha 1$ -AT)을 발현하는 유전자가 도입된 세포의 선별, 증식 및 동결보존

$\alpha 1$ -AT 유전자가 도입된 세포의 선별은 항생제 또는 마커 유전자를 이용하여 선별한다.  $\alpha 1$ -AT 유전자 벡터에 이용된 양성 마커(positive marker)인 암피실린(ampicillin) 항생제에 대한 저항성 유전자는 알파1-안티트립신 유전자가 세포에 도입되면 저항성 유전자도 발현된다.

$\alpha 1$ -AT 도입으로 세포 내로 유입된 DNA 구조체(construct)에 의해 적중된 세포는 항생제를 포함하여 배양하면 생존하게 되고, 그 외의 세포들은 항생제의 독성에 의해 사멸되어 일정 시간 후 배양 용기에는 유전자가 적중된 세포만 증식한다. 그러므로 전 단계에서 도입 후 정상 배양을 통한 일정 기간의 회복기가 지난 다음  $\alpha 1$ -AT가 도입되지 않은 세포들은 제거하고 도입된 세포들만 선별 마커(selective marker)의 항생제를 사용하여 선별한다.

이 같은 항생제에 의한 선별은 항생제의 적정 선별 농도를 정함으로써 효과적으로 이루어지도록 한다. 세포의 종류에 따라 차이가 있으나, 적중된 세포는 하나의 세포로부터 증식을 시작하게 되므로 다음 단계의 확인을 위해서는 일정 수 이상으로 증식시켜야 한다. 항생제를 통한 선별 과정이 이루어지면 정상 배양으로 전환하고, 세포의 신속한 증식과 배양시 세포 사멸에 의한 불필요한 손실을 감소시키기 위해 적절한 성장인자와 세포사멸 억제제 등을 첨가하는 방법을 적용한다.

또한, 마커 유전자로 녹색 형광 유전자인 GFP 유전자를 이용하여 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.  $\alpha 1$ -AT 유전자의 도입으로 세포 내로 유입된 DNA 구조체로 적중된 세포는 GFP 유전자에 의해 형미경 하에서 자외선 필터를 이용하여 관찰하면 초록색을 띄는 세포만을 선별한다.

GFP유전자 도입 세포의 증식 배양 및 동결 보존은 건술한 항생제 선별 및 GFP 발현유무로 선별한 형질전환 세포를 대상으로 한다. 핵 이식용 세포로 사용할 세포는 선별된 하나의 세포로부터 증식시키며, 특히 섬유아세포는 다수의 세포로 증식되기까지 상당한 시간이 소요되고 세포가 노화되어 증식이 둔화되면서 성장을 멈추기 때문에, 단 시간 내 강한 다수의 적중된 세포를 배양해야 한다. 증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위하여 각 단계마다 동결 보존한다. 특히 소수의 세포를 동결 보존하여 용해했을 때 생존성과 핵이식 시 핵공여 세포로서의 안정성에 적합토록 해야 한다.

#### 외래 유전자가 도입 및 적중된 체세포의 핵 이식을 통한 형질전환 복제란 및 형질전환 복제 동물을 생산하는 단계

본 발명에서는 형질전환 복제소를 생산하기 위한 방법으로 동물복제 기술을 이용할 수 있다. 상기 단계의 외래 유전자가 도입 및 적중된 체세포의 형질을 동물 복제 기술을 이용하여 복제되는 산자에 그대로 발현되도록 함으로써 모자 이기름(Mosaicism)이 없는 100% 형질전환 복제소를 효율적으로 생산할 수 있다.

본 발명에서의 체세포 복제 기술은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허출원 PCT/KR00/00707 '체세포 복제동물 및 그 생산 방법'(황 등, 2000.6.30)의 기술을 이용할 수 있다. 즉, 체세포 핵이식은 달핵 과정(enucleation)을 통해 미수정란으로부터 유전 물질(genetic material)을 포함한 핵을 제거하고 다른 체세포의 핵(nucleus)을 주입함으로써 이루어진다. 또한 이렇게 생산된 엠브리오(embryo)를 '재구성된 엠브리오(reconstructed embryo)'라고 하고, 이 핵이식된 재구성된 엠브리오를 체외 배양하여 발육시켜 대리모에 이식하여 체세포 복제 동물을 생산한다.

#### 제1단계: 수핵난자의 준비, 생체 외 성숙

소의 난소에서 미성숙 난자를 채취 및 배양하여 성숙한 수핵난자를 준비한다. 헤페스(HEPES, N-[hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 완충용액에 TCM199 (Tissue Culture Medium 199)가 용해된 세정용 TCM199 배지에서 채취된 미성숙 난자를 선별한 후, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에 16 내지 22시간 동안 배양하여 난자를 성숙시킨다.

이때, 사용되는 배양액은 TCM, 나트륨-피루브산 및 P/S 항생제가 포함된 배양용 TCM199 배양액에 에스트라디올(E)



estradiol, E2), 난포자극호르몬(FSH, follicle stimulating hormone) 및 소 태아 혈청을 포함한다.

## 제2단계: 수핵난자의 탈핵

상기 제1단계에서 준비된 성숙한 수핵난자의 난구 세포(cumulus cell)를 제거한 다음, 수핵난자의 투명대의 일부를 절개하고 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 탈핵된 난자를 작성한다.

먼저, 성숙한 수핵난자를 하이알루로니다제가 용해된 세정용 TCM199 배양액에 넣고 난구 세포를 물리적으로 제거한 후, 세정용 TCM199 배양액으로 세정한다. 그런 다음, 난구 세포가 제거된 난자를 사이토칼라신 B(cytochalasin B) 용액으로 옮기고, 미세작업장치(micromanipulator)를 이용하여 난자의 투명대를 절개하여 절개창을 형성시킨 후, 이를 통하여 난자의 전체 세포질의 10 내지 15%에 해당하는 양의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 탈핵시킨다. 이어, 탈핵된 난자를 세정용 TCM199 배양액으로 세정하고 배양용 TCM199 배양액에 정치시킨다. 이때 사용되는 사이토칼라신 B 용액은 사이토칼라신 B를 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시키고 이를 소 태아 혈청이 첨가된 세정용 TCM199 배양액으로 희석한 것이다.

자외선 하에서 Hoechst 33342(Sigma Co.)로 염색된 세포질체를 관찰함으로써 탈핵을 확인할 수 있다.

## 제3단계: 공여 핵 세포의 준비

공여 핵 세포의 준비를 위해 상기에서 형성된 전환된 세포를 PBS에서 세척한다. 그 후, 단일 세포 현탁을 위해 0.1% 트립신-EDTA를 사용하여 공여 핵 세포를 트립신 처리한다. 세포들을 펠릿화하고 0.5% (v/v) FBS가 포함된 200 $\mu$ l PBS에서 재현탁시키고 핵 이식에 사용하기 전에 마이크로원심판으로 옮긴다.

## 제4단계: 공여핵 세포와 수핵난자의 융합 및 활성화

상기에서와 같이 준비된 형질 전환된 공여 핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고, 이식된 핵 이식란을 전기융합을 통해 활성화시킨다.

먼저, 형질 전환된 공여 핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하여 핵 이식란을 작성한다. 배양용 TCM199 배양액에 정치된 탈핵된 난자를 세정용 TCM199 배양액으로 세정하고 PHA-P(phytohemagglutinin) 용액으로 이동시킨 다음, 이식용 피펫을 사용하여 공여 핵 세포를 PHA-P 용액에 있는 난자의 투명대에 형성된 절개창으로 주입시켜서 핵 이식란을 작성한다. 이어, 세정용 TCM199 배양액으로 세정하고 정치시킨다. 이때, 사용되는 PHA-P 용액은 PHA-P를 세정용 TCM199 배양액에 용해시킨 것이다.

상기 정치된 핵 이식란을 세포 조작기를 이용하여 전기융합시킨다. 먼저, 핵 이식란을 세정용 TCM199 배양액이 첨가된 만니톨(mannitol) 용액에 넣고 이를 세포 조작기에 연결시킨 2개 전극 사이에 분주된 만니톨 용액에 넣은 다음, 공여세포가 (+)전극을 향하도록 핵 이식란을 위치시킨다. 그런 다음, 전압은 0.75 내지 2.00kV/cm, 시간은 10 $\mu$ s 내지 20 $\mu$ s, 펄스는 0.01 내지 10초 간격으로 1회 내지 5회의 조건으로 교류전류를 통전하여 핵 이식란을 전기융합시킨다. 융합된 핵 이식란을 만니톨 용액과 세정용 TCM199배양액으로 세정하고, 전기 사이토칼라신 B 용액에서 정치한 후 활성화시킨다. 이때 사용하는 만니톨 용액은 HEPES 완충용액에 MgSO<sub>4</sub> 또는 MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, BSA 및 만니톨이 용해된 pH 7.2 내지 7.4의 용액으로서 Ca<sup>2+</sup>가 포함되어 있다면 융합과 동시에 활성화되지만, Ca<sup>2+</sup>가 포함되어 있지 않다면 활성화시키는 과정을 수행한다.

Ca<sup>2+</sup>가 포함되지 않은 만니톨 용액을 사용하여 세포 융합을 수행한 경우, 활성화시키는 과정은 융합된 핵 이식란을 알콜에서 이오노마이신(ionomycin) 용액에 정치하여 활성화시킨 후, 소 태아 혈청 또는 BSA가 첨가된 세정용 TCM199 배양액으로 세척하고 정치하여 이오노마이신을 제거한다. 이때, 이오노마이신 용액은 DMSO에 이오노마이신을 용해시켜서 원액을 만들고 사용할 때, BSA가 첨가된 세정용 TCM199 배양액으로 희석하여 사용한다.

## 제5단계: 핵 이식란의 후 활성화 및 체외 배양

활성화된 핵 이식란을 후 활성화시킨 후 체외 배양한다. 소 태아 혈청 또는 BSA가 첨가된 세정용 TCM199 배양액에 정치된 활성화된 핵 이식란을 시클로헥시미드(cycloheximide) 용액 또는 디메틸에피퍼 (DMAP, 4-dimethylaminopurine) 용액에 침지하여 배양하여 후 활성화시킨 다음, 체외 배양용 배지에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기 또는 5% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>, 88% N<sub>2</sub> 배양기를 사용하여 배양한다.

이때, 시클로헥시미드 용액은 에탄올에 시클로헥시미드를 용해시킨 용액으로서 체외 배양용 배지에 첨가하여 사용하고, DMAP 용액은 DMAP을 체외배양용 배지에 용해시켜 사용한다. 또한, 체외 배양용 배지는 NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Na-락테이트, 포도당, 페놀 레드, BSA, 카나마이신(kanamycin), 필수아미노산(EAA, ess

ential amino acid), 비필수아미노산(NEAA, non-essential amino acid), 글루타민 등을 포함하는 mSOF 배지(참조: 표 1)를 사용한다.

선택적으로, 상기의 체외 배양된 핵 이식란을 동결 보존한 후, 필요한 때에 이를 용해시켜서 사용할 수도 있다. 핵 이식란을 동결할 경우, 먼저 동결할 수정 란을 소 태아 혈청이 첨가된 PBS로 세정하고, P/S항생제,  $\text{CaCl}_2$ , 포도당,  $\text{MgCl}_2$ , Na-피루베이트 및 PBS를 포함하는 동결액에 넣은 다음, 온도를 완전히 저하시킨 후, 액체 질소로 동결시킨다.

이처럼 동결된 핵 이식란을 용해시킬 때는 액체질소에서 꺼낸 핵 이식란을 상온에서 일정기간 동안 정지했다가 온수에 넣어 용해시킨다. 용해된 핵 이식란을 글리세롤, 자당, BSA 및 PBS가 포함된 용해용 배지에 넣고, 글리세롤의 양이 많은 배지에서 적은 배지로 차례대로 정지시켜서 핵 이식란 내의 동결액을 제거한다.

상기의 성숙한 홀스타인종의 소에서 유래한 형질 전환된 체세포를 공여 핵 세포로 하여 제조한 핵 이식란을 SNU-B3로 명명하여, 이를 2002년 10월 23일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB) 유전자 은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호 KCTC 10356BP로 기탁하였다.

[표 1]

성 분	농 도
NaCl	99.1 ~ 106mM
KCl	7.2mM
$\text{NaHCO}_3$	25mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.2mM
Na-락테이트	5mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.7mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5mM
Na-피루베이트	0.3mM
포도당	1.5mM
페놀레드	$10\mu\text{g}/\ell$
BSA	$8\text{mg}/\text{ml}$
카나마이신	$0.75\mu\text{g}/\text{ml}$
필수아미노산	2%
비필수아미노산	1%
L-글루타민	1mM
ITS	0.5%

#### 제6단계: 형질전환 복제소의 출산

상기의 체외 배양된 핵 이식란을 대리모에 이식하여 송아지를 생산할 수 있다. 이때, 핵 이식란은 소 태아 혈청이 첨가된 PBS에 침적된 상태로 대리모의 자궁에 이식된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

#### <실시예 1>

사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자의 도입 및 적증을 위한 벡터의 작성

## 중합효소연쇄반응(PCR)

PCR은 사이키(Saiki) 등(1985)에 의해 처음으로 사용된 것의 변형 방법으로 수행되었다. PCR 증폭은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP (Takara Shuzo, Japan), 50 pmol의 업스트림 및 다운스트림 프라이머 및 2.5 유니트(unit)의 TaKaRa Taq 폴리머라제(Takara)를 포함하는 50 $\mu$ l 반응 혼합물 내에서 10 ng의 템플릿(template)과 함께 33 내지 49 사이클(cycle) 동안 수행되었다.

반응 사이클은 94°C에서, 30초간 변성(denature), 55°C에서 33초간 어닐링(annealing), 72°C에서 90초간 연장(extension) 및 72°C에서 15분간 마지막 연장(final extension)시키는 과정으로 수행되었다.

## 발현 플라스미드 작제

모든 플라스미드들은 표준 DNA 클로닝 과정(Maniatis 등, 1982) 및 PCR 방법에 의해 작제되었다. 벡터를 작제하기 위한 pcDNA3는 Invitrogen(Groningen, Netherlands)으로부터 구입하였다. p벡터(pbeta)3.7 플라스미드를 위한 3.7kb의 소 벡터 카세인 프로모터는 템플릿으로 다음의 소의 게노믹(genomic) DNA를 사용하여 PCR 증폭으로 제조하였다.

Forward primer(서열번호1):

GTCGGTACCAACATGT CGAATCCATCTCTATCAATTAATGTAATT

Reverse primer(서열번호2):

GACGGATCCT CATTATCTCAATTCCAGGGAATGGGAAGATGAGGA

상기에서 제조된 소 벡터 카세인 프로모터는 pcDNA3의 kpnI-BamHI자리에 삽입되었다. 또한, pGFP- $\alpha$ 1 플라스미드의 작제를 위한 사람  $\alpha$ 1-AT 유전자는 템플릿으로 사람 게노믹 DNA로 PCR 증폭 제조하여 p벡터 3.7kb의 XhoI-ApaI 자리에 삽입하였다. 또한 템플릿으로 pEGFP-N1(벡터(Clontech)로 PCR 증폭하여 제작한 GFP ORF의 SmaI-BstBI 단편을 삽입하여 pGFP- $\alpha$ 1AT를 작제하였다. 모든 작제된 플라스미드는 시퀀싱 및(U.S. Biochemical Co.)을 사용하여 DNA 시퀀싱에 의하여 확인되었다.

pGFP- $\alpha$ 1 AT의 작제도는 도 1에서와 같다. 즉, 도 1은 소  $\beta$ -카세인 프로모터, 사람  $\alpha$ 1-AT 유전자(1,257bp), 알 피실린 저항 유전자 및 마커 유전자로 녹색 형광 유전자(Green Fluorescent Protein, 이하 'GFP'라 한다)를 포함하는 벡터의 특징을 나타내는 개략도이다. PCR 증폭으로 준비한 사람 유전자(사람 알파1-안티트립신), 소  $\beta$ -카세인 프로모터 및 GFP는 TA 클로닝 방법으로 pGFP플라스미드 벡터 내로 삽입되었다. 발현 플라스미드의 XhoI 및 ApaI 부위로 원하는 유전자 등이 올바르게 삽입되었는지를 분석하기 위해 제한 효소로 절단하여 아가로스젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)하였다.

## 뉴클레오타이드 서열 분석(Nucleotide sequencing)

뉴클레오타이드 서열은 디데옥시 체인 종결 방법(dideoxy chain termination method)에 의해 확인되었다(Sanger 등, 1997). 서열은 35S-dATP (800 Ci/mmol, Amersham)이 삽입된 시퀀나제(sequenaser)로 분석되었다. DNA는 완충-경사도(buffer-gradient) 또는 전해질-경사도(electrolyte-gradient) 방법을 사용하여 6% PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리되었다. 모든 서열분석 방법은 미국 생화학(US Biochemicals)에 의해 제공되는 서열분석 키트(Sequencing kit)의 안내문에 따라 수행되었다.

## <실시예2>

### 세포주주의 확립

먼저, 소의 귀에서 채취한 피부 내측의 조직을 인산염 완충 식염수(PBS, Gibco BRL, Life Technologies, USA)로 세정하고 100 메시(mesh)의 크기로 세절한 다음, 이를 상기 인산염 완충 식염수에 넣고 0.25% 트립신, 1mM EDTA(Ethylenediamine Tetraacetic Acid) 및 1mg/ml콜라게나제(collagenase type II)를 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>의 포화습도 배양기 내에 1시간 동안 정치시킨 후, 원심세정시킨다. 그런 다음, 10% 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), 1% 비필수 아미노산 용액 및 P/S항생제가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagles medium, Gibco BRL, Life Technologies, USA) 배양액에서 부유시키고, 이를 세포 배양용 디쉬로 옮겨 39°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 포화습도 배양기 내에서 배양하여, 세포주를 수득하였다. DMEM에서 배양 중인 세포주를 0.5% 소 태아 혈청이 첨가된 DMEM에서 7일간 배양한 다음, 배지를 제거하고 0.25% 트립신, 1mM EDTA 용액을 첨가하여 2분간 정치시켰다. 그런

다음, 1% 소 태아 혈청이 첨가된 PBS에 재부유시켜서 세포의 수가 2000개/0.1ml가 되도록 조절하고, 이를 에펜돌프(ependorf) 시험관에 분주하여 공여세포를 준비하였다.

### <실시예3>

#### 사람 $\alpha$ 1-AT 유전자의 도입 및 적중을 통한 체세포의 형질전환

작성된 pGFP- $\alpha$ AT 발현 플라스미드를 FuGene6(Cat. No. 1814443; Roche Molecular Biochemicals, IN, USA)을 사용하는 리피드-매개 방법(lipid-mediated method)으로 공여핵 세포 내로 삽입하였다.

세포들은 형질전환 전 1일 동안 2차 배양되었다. 세포들은 35mm 디쉬에서 2ml당  $1-3 \times 10^5$  세포의 수로 플레이트(plate)되고, 50-80%의 컨플루언시(confluency)에 도달할 때까지 밤새 배양되었다. 그 후, pGFP- $\alpha$ AT 발현 플라스미드는 실험자 프로토콜에 따른 FuGene6을 사용하여 세포주 내로 삽입되었다. 간단히 말해서, pGFP- $\alpha$ AT 유전자 (1  $\mu$ g) + 형질전환 시약(3 $\mu$ g) + DMEM(96 $\mu$ l)의 혼합물을 상온에서 15분간 배양한 후에 배양 배지상에 오버레이(overlay)하였다.

### <실시예4>

#### 사람 $\alpha$ 1-AT를 발현하는 유전자가 도입된 세포의 선별, 증식 및 동결보존

사람  $\alpha$ 1-AT 유전자를 도입된 세포주는 항생제 또는 GFP의 발현을 관찰함으로써 선별하였다. 유전자 적중시 DNA 구조체(DNA construct)에 이용된 양성 마커인 암피실린 등 항생제에 대한 저항성 유전자는 세포 내에서 재조합이 정확하게 이루어지면 저항성 유전자 및 GFP 유전자가 발현된다.

본 발명에는 암피실린(ampicillin) 항생제를 통한 선별 과정이 이루어졌으며 3-4일 간격으로 3주간 선별하였다. 또한, 형질전환 후 2일에 형질전환된 각 세포를 자외선 하에서 표준 플루오레세인 이소토포사이아네이트(FITC; 여기 파장: 450-490 nm; B-mode filter, Nikon, Japan) 필터 셋을 사용하여 검사하여 GFP의 발현 여부를 검사하여 형질전환된 세포를 선별하였다(도 2).

진술한 항생제 선별 또는 GFP 발현 여부로 유전자 적중이 확인된 사람  $\alpha$ 1-AT 유전자가 도입된 세포는 핵 이식용 세포로 증식 배양하였다. 특히 섬유아세포는 다수의 세포로 증식되기까지 상당한 기간이 소요되고 점차 세포가 노화되어 증식이 둔화되면서 성장을 멈추기 때문에 단시간 내 건강한 다수의 적중된 세포를 배양하는 것이 관건이다. 암피실린 항생제 선별 후 세포들은 하나의 집락(colony)으로 자라게 되는데 이를 트립신으로 처리하여 96-웰(96-well)의 배양용기로 옮겨 배양 한 후 이들이 증식되면 이후 24-웰로 옮겨 배양하고 더 나아가서 12-웰과 6-웰까지 증식 배양을 실시하였다.

증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위하여 각 단계마다 동결 보존하였다. 특히 소수의 세포를 동결 보존하여 융해했을 때 생존성과 핵이식 시 핵 공여세포로서의 안정성에 적합토록 해야한다.

### <실시예5>

#### 수핵난자의 준비

도축장에서 채취된 소의 난소로부터 18G 주사침(needle)이 장착된 10ml 주사기를 사용하여 직경 4mm 내외의 난포를 흡입한 다음, 1cm 간격의 격자 눈금을 그은 100mm 디쉬에 난포를 옮긴 후, 난포 세포가 충분히 부착되어 있고 세포질이 균질한 난자를 선별하였다.

선별된 난자를 세정용 TCM199 배양액(참조: 표 2)이 2ml씩 분주된 35mm 디쉬에서 3회에 걸쳐 세정하고, 배양용 TCM199 배양액(참조: 표 3)으로 최종적으로 세정한 다음, 에스트라디올(estradiol) 용액(참조: 표 4) 0.5 $\mu$ l, 난포자극 호르몬 용액(참조: 표 5) 12.5 $\mu$ l, 배양용 TCM199 배양액 450 $\mu$ l 및 10% 소 태아 혈청이 포함된 배지에서 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 20시간 동안 배양하여 수핵난자를 준비하였다.

[표 2]

성분	농도
TCM 분말	Gibco 31100-027

HEPES	10mM
NaHCO <sub>3</sub>	2mM
BSA	0.5% W/V
P/S항생제	1% (페니실린 10000IU, 스트렙토마이신 10mg)

[표 3]

성 분	농 도
TCM 액체	Gibco 11150-059
Na-피루베이트	1mM
P/S항생제	1% (페니실린 10000IU, 스트렙토마이신 10mg)

[표 4]

성 분	농 도
에스트라디올	5mg
에탄올	10mL

[표 5]

성 분	농 도
난포자극호르몬	2AU
배양용 TCM199배양액	10mL

#### <실시예6>

##### 체세포의 핵 이식

상기 실시예 5에서 준비된 수핵난자를 세정용 TCM199 배양액에서 1회 세정하고, 5mL의 세정용 TCM199 배양액에 하이알루로니다제(hyaluronidase, Sigma Chemical Co., USA) 0.0500g을 용해시킨 용액 111μL과 세정용 TCM199 배양액 1mL을 혼합하여 최종 농도를 0.1%로 적정한 하이알루로니다제 용액 내에 난자를 옮긴 다음, 난구 세포를 제거하고 세정용 TCM199 배양액에서 3회 세정하고 정치시켰다. 이어, 7.5mg/mL의 농도가 되도록 DMSO에 사이토칼라신 B(cytochalasin B, Sigma Chemical Co., C-6762, USA)를 용해시킨 용액 1μL와 10% 소 태아 혈청이 첨가된 세정용 TCM199 배양액 1mL을 혼합한 사이토칼라신 B 용액으로 난자를 옮기고, 미세작업장치(micromanipulator, Narishige, Japan)를 사용하여 절치된 수핵난자의 투명대를 절개하여 절개창을 형성시킨 후, 이를 통하여 전체 세포질의 10 내지 15%에 해당하는 양의 난자의 세포질을 제거함으로써 난자를 탈핵시켰다.

좀 더 구체적으로 탈핵과정을 설명하면, 작업용 디쉬를 미세작업장치의 미세작업판(micromanipulator plate) 위에

놓고, 미세작업장치의 원축 암(arm)에는 고정용 피켓을, 오른쪽 암에는 절개용 피켓을 장착하였다. 그런 다음, 고정용 피켓은 9시 방향에 위치시키고 절개용 피켓은 3시 방향에 위치시켰다. 피켓 조정기를 증압에 놓아 피켓이 상하 좌우로 자유롭게 움직일 수 있도록 조정하였다. 두 피켓을 작업용 미소적에서 상하 이동시키면서, 피켓이 다수의 테두리에 닿지 않도록 각도를 조정하고, 피켓 끝을 미소적의 중앙에 위치시켰다. 내경 200 $\mu$ m 이상의 세정용 마우스 피켓을 이용하여 세정용 TCM199배양액에서 난자를 사이토크라신 B 용액으로 이동시켰다. 이어, 미세작업장치의 조동나사와 미동나사를 이용하여 난자에 먼저 초점을 맞추고, 2개의 피켓을 상하로 움직여 초점을 조정하였다. 2개의 피켓을 움직여서 고정용 피켓의 12시 방향에 제 1극체(the first polar body)가 위치하도록 하고, 고정용 피켓을 난자의 9시 방향에 밀착시킨 뒤, 유압을 걸어 난자를 고정시켰다.

도 3은 고정용 피켓과 절개용 피켓으로 수핵난자의 두명대를 절개하는 과정을 나타낸다. 도 3에서 보듯이, 절개용 피켓(2)을 1시 방향에서 쥘러서 두명대를 통과시킨 후, 세포질에 손상을 가하지 않도록 주의하며 11시 방향으로 판통시켰다. 고정용 피켓(1)에 압력을 걸어 난자(3)를 분리하고, 절개용 피켓이 통과한 제 1극체 상단부의 두명대에 고정용 피켓을 접촉시킨 다음, 두 피켓을 마찰하여 두명대를 절개하였다.

도 4는 수핵난자의 제 1극체와 핵을 제거하는 탈핵과정을 나타낸다. 도 4에서 보듯이 난자(3)를 회전시켜 절개창을 수직으로 위치시키고, 고정용 피켓(1)을 난자의 밑 부위에 위치시켜 난자가 아래쪽으로 움직이지 못하도록 지지한 다음, 절개용 피켓(2)을 난자의 위에서 가볍게 눌러 난자를 탈핵시켰다. 이처럼 탈핵된 난자를 세정용 TCM199배양액으로 3회 세정하고, 배양용 TCM199 배양액에 정지시켰다.

그런 다음, 미세작업장치를 사용하여 탈핵된 수핵난자에 준비된 공여세포를 이식하였다. 먼저, 5mg의 PHA-P(phyto hemagglutinin)를 10ml의 세정용 TCM199 배양액에 용해시킨 용액 100 $\mu$ l과 400 $\mu$ l의 세정용 TCM199 배양액을 혼합한 PHA-P 용액으로 작업을 더위 차단 중앙에 4 $\mu$ l의 이식을 미소적을 만들고, 1% 소 테아 혈청이 첨가된 PBS로 이식을 미소적 위 아래에 각각 1개의 4 $\mu$ l의 공여세포 미소적을 만들었다. 이들 미소적을 미세날 오일로 도포한 후, 작업을 더위를 미세작업판에 위치시켰다.

미세작업장치에 장착된 절개용 피켓을 이식을 피켓으로 교체한 후, 정지된 탈핵된 난자를 세정용 TCM199배양액으로 3회 세정하고, 이식용 미소적으로 이동시킨 다음, 이식용 피켓을 사용하여 공여세포를 이식용 미소적으로 이동시켰다.

도 5는 탈핵된 난자에 체세포를 이식하는 과정을 나타낸다. 도 5에서 보듯이, 탈핵된 난자(3)의 절개창을 양 피켓과 1시 방향으로 놓고 고정용 피켓(1)으로 고정한 다음, 이식용 피켓(4)을 절개창으로 주입하고, 유압으로 공여세포를 주입하여 핵 이식관을 작성하였다. 이처럼, 작성된 핵 이식관을 세정용 TCM199배양액으로 옮겨서 3회 세정 후, 정지시켰다.

#### <실시예7>

##### 세포 융합 및 활성화

BTX-세포 조작기(electro cell manipulator, ECM 2001, BTX, USA)를 사용하여 핵 이식관을 전기 융합하여 활성화시켰다.

0.5mM HEPES 완충용액(pH 7.2)에 0.1mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05% BSA 및 0.28M 만니톨(mannitol)을 용해시킨 만니톨 용액 15 $\mu$ l을 세정용 마우스 피켓으로 핵 이식관이 있는 세정용 TCM199 배양액에 첨가하고, 1분간 정지시켰다. 그런 다음, 세정용 마우스 피켓을 이용하여 핵 이식관을 세정용 TCM199 배양액이 첨가된 만니톨 용액에 주입하여 다시 1분간 정지시키고, 세정용 마우스 피켓을 이용하여 핵 이식관을 만니톨 용액에 넣었다. 이어, 핵 이식관을 BTX-세포 조작기에 연결시킨 2개 전극(3.2mm chamber No. 453) 사이에 분주된 만니톨 용액에 넣고, 공여세포가 (+)전극을 향하도록 핵 이식관을 위치시켰다. 전압은 0.75kV/cm 내지 2.00kV/cm, 시간은 10 $\mu$ s 내지 20 $\mu$ s, 횟수는 0.01초 ~ 10초 간격으로 1~5회의 조건에서 직류전류를 통전하여 핵 이식관을 전기 융합시켰다. 융합된 핵 이식관을 만니톨 용액을 거쳐 세정용 TCM199 배양액으로 옮긴 후, 3회 세정하였다.

DMSO 1.34ml에 이오노마이신(ionomycin, Sigma Chemical Co., USA) 1mg을 용해시키고, 최종농도가 5  $\mu$ M이 되도록 1% BSA가 첨가된 세정용 TCM199배양액을 첨가하여 제조된 이오노마이신 용액에 융합된 핵 이식관을 10초에서 4분간 정지하여 활성화시킨 후, 융합된 핵 이식관을 10% 소 테아 혈청이 첨가된 세정용 배지가 분주된 35mm 디쉬 내에서 5분간 정지시켜서 이오노마이신을 제거하였다.

#### <실시예8>

##### 융합된 핵 이식관의 후 활성화 및 배양

에탄올 100 $\mu$ l에 시클로헥시미드(cycloheximide, Sigma Chemical Co., USA) 1g을 용해시키고, 최종농도가 10 $\mu$ g/ $\mu$ l가 되도록 체외배양용 배지인 mTALP(참조: 표 1)과 혼합한 시클로헥시미드 용액 25 $\mu$ l에 전기 활성화된 핵 이식란을 침지하고, 4시간 동안 배양하여 후 활성화시켰다. 그런 다음, 감란하여 선별된 핵 이식란을 mTALP에 넣고, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 7일간 배양하였다.

본 발명자들은 상기 실시예에 따라 제조한 핵 이식란을 SNU-3로 명명하여, 이를 2002년 10월 23일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB) 유전자 은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소제)에 기탁번호KCTC 10356BP로 기탁하였다.

#### <실시예9>

##### 핵 이식란의 동결보존, 융해 및 이식

상기 핵 이식란을 장기간 보존하기 위하여, 동결 보존을 수행하였다. 먼저, 동결용 배지(참조: 표 6, 표 7)를 35mm 더쉬에 분주하고, 동결기를 가동하여 -5℃를 유지시킨 다음, 동결할 핵 이식란을 선발하여 10% 소 태아 혈청이 첨가된 PBS로 세정하고 동결용 배지에 넣어 20분간 정지시켰다. 이어, 0.25ml 스트로우(straw)의 양 끝단에 공기층을 2층씩 만들어 가운데에 수정란이 포함된 동결용 배지를 흡입하여 수정란을 장착하고, 가열한 집게(forceps)를 사용하여 열밀봉(heat sealing)하였다. 그런 다음, -5℃에서 동결기에 스트로우를 장착하고, 5분간 이 온도를 유지시킨 다음 액체질소로 예냉한 집게로 스트로우의 하단을 살짝 집어주어 식빙(seeding)시켰다. 식빙한 직후, -0.3℃/min의 속도로 -30℃까지 온도를 하강시킨 다음 -30℃가 되면 10분간 온도를 유지시키고, 이를 액체질소 탱크에서 동결보존하였다.

[표 6]

성분	농도
PBS(1x)	Gibco 14190-144
Na-피루베이트	0.033mM
포도당	0.15mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.171mM
P/S항생제	1% (페니실린 10000IU, 스트렙토마이신 10mg)
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.049mM

[표 7]

성분	농도
동결용 PBS(표 8)	2.25mℓ(45%)
소 태아 혈청	2.25mℓ(45%)
글리세롤	0.5mℓ(10%)

이처럼 동결보존한 핵 이식란을 용해시키기 위하여, 먼저 20% 소 태아 혈청이 첨가된 PBS와 용해용 배지를 35mm 더쉬에 3mℓ씩 분주하고, 각각에 글리세롤을 첨가하여 포함된 글리세롤 농도가 0%, 3% 및 6%가 되도록 제조하였다 (참조: 표 6, 표 8). 그런 다음, 액체질소 탱크로부터 동결된 스트로우를 꺼내 공기 중에서 5초간 노출시킨 후, 직경 20 cm 이상인 용기에 담겨진 30℃의 온수에 30초간 담가서 용해시켰다. 이어, 무균적으로 스트로우의 양 끝단 공기층을 절단하여, 스트로우 내의 배지를 더쉬에 밀어내고, 현미경하에서 수정란을 확인한 다음, 차례대로 핵 이식란을 6% 글리세롤의 용해용 배지에서 5분간 정지하고, 3% 글리세롤의 용해용 배지에서 5분간 정지하며, 글리세롤이 없는 용해용 배지에서 5분간 정지시킴으로 써, 핵 이식란에 함유된 동결용 배지를 제거하였다.

[표 8]

성 분	6% 글리세롤 PBS	3% 글리세롤 PBS	0% 글리세롤 PBS
PBS	(표 8)	(표 8)	(표 8)
BSA	0.5%	0.5%	0.5%
글리세롤	6%	3%	0%
자당	0.3M	0.3M	0.3M

# <실시예10>

## 핵 이식란의 대리모에의 이식

상기 핵 이식란을 20% 소 태아 혈청이 첨가된 PBS에 침적시키고, 이를 스트로우에 장착한 다음, 대리모의 자궁내내 심부에 이식하였다.

# <실시예11>

## 사람 $\alpha$ 1-AT 유전자를 발현하는 복제 소의 산자 생산 및 산자의 유전자 확인

상기의 실시예를 통해 생산된 형질전환 복제소는 육안적 방법 및 분자생물학적 방법으로 유전자 분석을 하였다. 사람  $\alpha$ 1-AT 유전자가 도입된 GFP 발현 복제소는 외견관찰 및 조직을 이용한 서던블랏(Southern blot), 웨스턴블랏(Western Blot) 및 세포배양을 통하여 GFP 발현 및 사람  $\alpha$ 1-AT 유전자 도입을 분석하였다.

육안적 관찰로 GFP의 발현 유무를 육안적으로 GFP 산자의 피부조직, 구강조직, 혀 등을 관찰하여 초록빛이 관찰되는지를 조사하였다. 분자생물학적 검사로 서던블랏으로 산자의 게노믹 DNA를 분석하였으며 웨스턴블랏으로 산자 조직의 단백질을 분석하여 사람  $\alpha$ 1-AT 발현 복제소임을 확인하였다.

이후 산자의 조직을 실시예2의 방법으로 배양하여 세포주를 확립한 후 현미경의 자외선 필터를 이용하여 GFP 단백질의 발현 여부를 분석하였다. 또한 분자생물학적 방법인 서던블랏으로 복제 소의 DNA를 분석하여 사람  $\alpha$ 1-AT를 발현하는 복제 소임을 확인하였다.

# <실시예12>

## 공여핵 세포의 종류에 따른 형질전환 핵 이식란의 발육률 및 발현율

상기의 실시예와 동일한 과정을 공여핵 세포를 달리하여 형질전환 이식란의 발육률 및 발현율을 비교하였다. 3개의 세포주로 40~50일령의 태아에서 유래한 소 태아의 섬유아세포, 성숙한 소의 귀 섬유아세포 및 성숙한 소의 난구 세포를 사용하였다.

준비된 3개의 세포주에 사람  $\alpha$ 1-AT를 도입 및 적중하고, 외래 유전자가 도입 및 적중된 세포를 탈핵 난자와 융합하여 발생하는 결과를 살펴보았다. 그 결과는 다음의 표 9 및 표 10에 나타내었다.

[표 9]

공여핵 세포의 종류	엠브리오의 수				
	주입	융합(%)	분할(%)	배반포로의 발생(%)	배반포에서의 발현(%)
태아 섬유아세포	363	214(59.0)	109(50.9)	15(7.0)	4(26.7)
난구 세포	426	334(78.4)	245(73.4)	96(28.7)	52(54.2)
귀 섬유아세포	379	303(79.9)	203(67.0)	46(15.2)	13(28.3)



[표 10]

공여핵 세포의 종류	이식된 엠브리오의 수	태리모의 수	임신된 수(%)
태아 섬유아세포	3	2	0
난구 세포	31	28	1(3.6)
귀 섬유아세포	27	24	2(8.3)

상기의 결과로부터 태아 섬유아세포보다는 성숙한 소로부터 유래한 난구 세포 또는 귀 섬유아세포를 핵 공여세포로 한 경우에 배반포에서의 발현율이 높고, 또한 엠브리오의 임신 성공률이 높다는 것을 알 수 있었다.

#### 발명의 효과

본 발명은 체세포에 외래 유전자를 도입 및 적중하는 기술 및 체세포 복제 기술을 접목함으로써 복제 동물로부터 생물의약품을 경제적이며 효율적으로 생산하는 방법을 제공한다.

특히, 본 발명의 형질전환 복제 소는 소의 유선에서 사람 알파1-안티트립신을 발현함으로써 소의 우유로부터 사람 알파1-안티트립신을 용이하게 수득하는 것을 가능하게 한다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

소에서 유래한 외래(exogenous) 유전자가 도입 및 적중된 체세포의 핵과 소에서 유래한 탈핵된 난모 세포가 융합된 핵 이식란.

##### 청구항 2.

제 1항에 있어서,

상기 외래 유전자가 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자임을 특징으로 하는 핵 이식란.

##### 청구항 3.

제 1항에 있어서,

상기 소는 세포는 성숙한(adult) 개체임을 특징으로 하는 핵 이식란.

##### 청구항 4.

제 3항에 있어서,

상기 소가 홀스타인종임을 특징으로 하는 핵 이식란.

##### 청구항 5.

제 1항에 있어서,

상기 소의 핵 이식란이 SNU-B3(KCTC 10356BP)인 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란.

##### 청구항 6.

소의 유선에서 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 것을 특징으로 하는 형질 전환 복제 소.

**청구항 7.**

제 6항에 있어서,

상기 복제 소의 형질이 제 1항의 핵 이식란의 형질과 동일한 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소.

**청구항 8.**

제 7항에 있어서,

상기 핵 이식란이 SNU-B3(KCTC 10356BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소.

**청구항 9.**

(a) 소에서 유래한 체세포주에 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함하는 공여핵 세포를 준비하는 단계;

(b) 수핵난자의 난구 세포를 제거하고, 수핵난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함하는 소 유래의 성숙한 수핵난자를 준비하는 단계; 및

(c) 상기 단계에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시키는 단계를 포함하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 10.**

제 9항에 있어서,

상기 체세포가 성숙한 소에서 유래된 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 11.**

제 10항에 있어서,

상기 소가 홀스타인종임을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 12.**

제 9항에 있어서,

상기 세포주에 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계는

사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자, 발현 프로모터, 마커 유전자를 포함하는 벡터를 작제하여 수행되는 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 13.**

제 12항에 있어서,

상기 발현 프로모터는 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자가 소의 유선에서 발현하도록  $\beta$ -카세인 프로모터인 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 14.**

제 12항에 있어서,

상기 마커 유전자는 GFP 발현 유전 및/또는 암피실린 저항 유전자인 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 15.**

제 12항에 있어서,

상기 벡터는 생화학적 방법을 사용하여 도입되는 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

**청구항 16.**

제 15항에 있어서,

상기 생화학적 방법이 FuGene6을 사용하는 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

#### 청구항 17.

제 9항에 있어서,

상기 체세포는 소의 자궁관류액, 자궁내막, 난관, 귀 또는 근육으로부터 분리된 세포 또는 난구 세포로부터 유래된 것을 특징으로 하는 소의 핵 이식란 작제 방법.

#### 청구항 18.

제 9항에 있어서,

상기 핵 이식란이 SNU-B3(KCTC 10356BP)인 것을 특징으로 하는 핵 이식란 작제 방법.

#### 청구항 19.

(a) 소에서 유래한 체세포주에 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계를 포함하는 공여핵 세포로 준비하는 단계;

(b) 수핵난자의 난구 세포를 제거하고, 수핵난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함하는 소 유래의 성숙한 수핵난자를 준비하는 단계;

(c) 상기 단계에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시켜 핵 이식란을 작제하는 단계; 및 상기 핵 이식란을 대리모에 이식하여 산자를 출산하는 단계를 포함하는 소의 유선에서 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 20.

제 19항에 있어서,

상기 체세포는 성숙된 소에서부터 유래된 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 21.

제 20항에 있어서,

상기 소는 홀스타인종인 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 22.

제 19항에 있어서,

상기 핵 이식란이 SNU-B3(KCTC 10356BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 23.

제 19항에 있어서,

상기 세포주에 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자를 도입 및 적중시키는 단계는

사람 알파1-안티트립신 유전자, 발현 프로모터, 마커 유전자를 포함하는 벡터를 작제하여 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 24.

제 23항에 있어서,

상기 발현 프로모터가 상기 알파1-안티트립신을 발현하는 유전자가 소의 유선에서 발현하도록  $\beta$ -카세인 프로모터 인것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

#### 청구항 25.

제 23항에 있어서,

상기 마커 유전자는 GFP 발현 유전자 및/또는 암호화된 저항 유전자인 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산 방법.

**청구항 26.**

제 23항에 있어서,

상기 벡터는 생화학적 방법을 사용하여 도입되는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 27.**

제 26항에 있어서,

상기 생화학적 방법이 FuGene6를 사용하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 28.**

제 19항에 있어서,

상기 세포는 소의 자궁관류액, 자궁내막, 난관, 귀 또는 근육으로부터 분리된 세포 또는 난구 세포로부터 유래된 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 29.**

제 19항에 있어서,

상기 (a)단계는 세포주를 계대배양, 혈청기아배양 또는 동결에 의해 보존하는 과정을 더 포함하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 30.**

제 19항에 있어서,

상기 (c)단계의 수핵난자의 난구 세포를 제거하는 과정은 수핵난자를 하이알루로니다제로 처리한 다음, 물리적으로 제거하는 과정을 포함하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 31.**

제 19항에 있어서,

상기 (c)단계의 난자를 탈핵하는 과정은 미세작업장치를 이용하여 전처리된 난자의 투명대를 절개하여 절개창을 형성시킨 후, 절개창을 통하여 난자의 제 1극체를 포함한 세포질을 10 내지 15% 제거하는 것을 포함하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 32.**

제 19항에 있어서,

상기 (c)단계의 공여핵 세포를 탈핵 난자에 이식하는 과정은 공여세포를 난자의 투명대에 형성된 절개창으로 주입하는 것을 포함하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 33.**

제 19항에 있어서,

상기 (c)단계는 작제된 핵 이식관을 대리모에 이식하기 전에 활성화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 34.**

제 33항에 있어서,

상기 핵 이식관의 활성화는 전기 용합을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

**청구항 35.**

제 34항에 있어서,

상기 전기융합은 직류전압을 0.75 내지 2.00 kV/cm, 시간을 10 $\mu$ s 내지 20 $\mu$ s, 횟수는 0.01초 내지 10초 간격으로 1 회 내지 5회에 걸쳐 실시하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

### 청구항 36.

제 34항에 있어서,

상기 핵 이식란의 활성화는 Ca<sup>2+</sup>가 첨가된 배지에서 전기융합을 실시하여, 융합과 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

### 청구항 37.

제 34항에 있어서,

상기 핵 이식란의 활성화는 Ca<sup>2+</sup>가 없는 배지에서 전기융합을 실시하고, 암 조건하에 이오노마이신(ionomycin) 용액에서 정치하여 수행하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

### 청구항 38.

제 33항에 있어서,

상기 단계는 시클로덱시미드 용액 또는 디엠페이퍼(DMAP) 용액에 핵 이식란을 침지하고 배양하는 후 활성화 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

### 청구항 39.

제 38항에 있어서,

상기 핵 이식란의 후 활성화 단계는 후 활성화된 핵 이식란을 mSOF 배지에 배양하는 체외배양 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 복제 소의 생산방법.

### 청구항 40.

소의 유전에서 사람 알파1-안티트립신을 발현하는 형질전환 복제 소를 생산하여 상기 소의 우유로부터 사람 알파1-안티트립신을 수득하는 것을 특징으로 하는 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 방법.

### 청구항 41.

제 40항에 있어서,

상기 형질전환 복제 소는 소의 핵 이식란 SNU-B3(KCTC 10356BP)으로부터 생산된 것임을 특징으로 하는 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 방법.

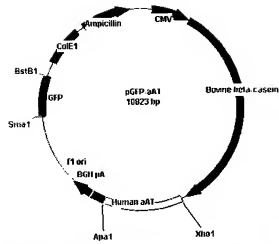
### 청구항 42.

제 40항에 있어서,

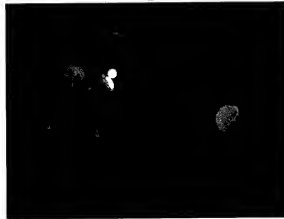
상기 형질전환 복제 소는 상기 제 17항 내지 제 37항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 것을 특징으로 하는 사람 알파1-안티트립신을 생산하는 방법.

도면

도면1



도면2



도면3



도면4



도면5



<110> WHANG, Woo Suk  
 <120> Transgenic cloned cow producing human Alpha1-antitrypsin and  
 method for producing the same  
 <160> 3  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FORWARD PRIMER  
 <400> 1  
 gtccgtacca acaatgctgaa tccatctcta tcaattaatg taatt  
 <210> 2  
 <211> 45

45

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	REVERSE PRIMER	
<400>	2	
	gacggatcct cattatctca attccagga atgggaagat gaggga	45
<210>	3	
<211>	1257	
<212>	DNA	
<213>	Human Alpha-Antitrypsin	
<400>	3	
	atgccgtctt ctgtctctg gggcatcctc ctgctggcag gccctgtctg cctggctcc	60
	gtctccctgg ctgaggatcc ccaggagat gctgccaga agacagatc atcccacat	120
	gatcaggatc acccaacct caacaagatc accccaacc tggctgagtt cgccttcagc	180
	ctataccgcc agctggcaca ccagtccaac agcaccaata tcttctctc cccagtgagc	240
	atcgctacag cctttgcaat gctctccctg gggaccaagg ctgacactca cgaatgaaac	300
	ctggagggcc tgaatttcaa cctcacggag attccggagg ctgacatcca tgaaggcttc	360
	caggaaactc tccgtacct caaccagca gacagccagc tccagctgac caccggcaat	420
	ggcctgttcc tcagcggagg cctgaagcta gtgataagt ttttgaggga tgttaaaaag	480
	ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttccgggaca ccgaagaggc caagaaacag	540
	atcaacgatt acgtggagaa gggtaactca gggaaaattg tggatttgg caaggagctt	600
	gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttct ttaaaggcaa atggagaga	660
	cccttgaag tcaaggacac cgagggaag gacttccagc tggaccaggt gaccaccgtg	720
	aaggtgctta tgaatgaagc tttaggcagc tttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc	780
	agctgggtgc tgcctgatga atacctgggc aatgccaccg ccactcttct cctgcctgat	840
	gaggggaaac tacagcacct ggaataatga ctcaaccacg atatcatcac caagtctctg	900
	gaaaatgaag acagaaggtc tgccagctta catttaccca aactgtccat tactggaacc	960
	tatgatctga agagcgtctt ggttcaactg ggcatactta aggtcttcag caatggggct	1020
	gacctctcgg ggttcacaga ggggacacc ctgaagctct ccaaggccgt gcataaggct	1080
	gtgctgacca tcgacagaaa agggactgaa gctgctgggg ccatgttttt agaggccata	1140
	cccatgicta tccccccgga ggtcaagtic aacaaacct ttgtctcttt aatgatgaa	1200
	caaaatacca agtctccctt ctcatggga aaagtggtga atcccaacca aaaataa	1257